

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)L.-O.-Munich
83

11. Juli 2003

REC'D 11 AUG 2003
WIPO PCT**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 29 210.8

Anmeldetag: 28. Juni 2002

Anmelder/Inhaber: november Aktiengesellschaft Gesellschaft für
Molekulare Medizin, Erlangen/DE

Bezeichnung: Vorrichtung zur Detektion eines Analyten

IPC: G 01 N 27/327

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Vorrichtung zur Detektion eines Analyten

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Detektion eines in einer Flüssigkeit enthaltenen Analyten. Der Analyt kann gelöst oder suspendiert vorliegen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung und elektrischen Kontaktierung der Vorrichtung. Darüber hinaus betrifft die Erfindung eine Verwendung der Vorrichtung zur Detektion eines Analyten.

- Aus Sosnowsky et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 94, Seiten 1119 bis 1123 ist ein Silizium-Chip mit einer Anordnung von Elektroden zum Nachweis einer Nukleinsäure in einer Lösung bekannt. Auf den Elektroden sind über eine Zwischenschicht Fänger-Moleküle immobilisiert, die Analyten spezifisch binden. Die Elektroden werden durch Leitungen auf der Oberfläche des Chips elektrisch kontaktiert. Die Leitungen sind durch eine Siliziumnitrid-Schicht isoliert. Durch Anlegen eines negativen oder positiven Potentials an die Elektroden können geladene Analyte zu den Elektroden mit den Fänger-Molekülen gezogen werden und an die Fänger-Moleküle binden. Ungebundene oder unspezifisch gebundene Analyten können durch Umpolen wieder von dem Bereich der Elektroden entfernt werden. Die Detektion des spezifisch gebundenen Analyten erfolgt mittels Fluoreszenz.

- Weiterhin ist von der Firma Motorola ein unter der Bezeichnung eSensorTM vertriebener Biochip bekannt, bei dem auf der Oberfläche Goldelektroden angeordnet sind. Die Goldelektroden sind seitlich auf der Oberfläche des Biochips kontaktiert. An den Elektroden sind über eine Zwischenschicht Fänger-Moleküle

immobilisiert. Der Nachweis eines über die Fänger-Moleküle an eine Elektrode gebundenen Analyten erfolgt mittels Reporter-Molekülen, welche an den gebundenen Analyten binden und elektrochemisch detektierbare Marker aufweisen. Die Bindung dieser Reporter-Moleküle wird elektrochemisch nachgewiesen.

Die genannten Elektrodenanordnungen sind aufwändig herzustellen. Sie erfordern z.B. lithografische Techniken. Um den Kontakt der elektrischen Leitungen zu den Elektroden mit einer den Analyten enthaltenden Lösung zu verhindern, muss eine Schutzschicht auf die Leitungen aufgetragen werden. Weiterhin ist es für bestimmte Anwendungen, z.B. als Boden einer Mikrofluidkammer, erforderlich ist, dass der Biochip eine glatte Oberfläche aufweist. Um die durch die Leitungen bedingten Unebenheiten auszugleichen muss daher eine Ausgleichsschicht aufgetragen werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine Vorrichtung mit Elektroden zur Detektion eines Analyten bereitgestellt werden, die einfach herzustellen ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 19, 21, 32 und 35 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 18, 20, 22 bis 31, 33, 34 und 36 bis 48.

Erfindungsgemäß ist eine Vorrichtung zur Detektion eines Analyten in einer Flüssigkeit mit auf einer ersten Seite einer elektrisch nicht leitenden und für die Flüssigkeit undurchlässigen Platte angeordneten voneinander isolierten Elektroden vorgesehen, wobei die Elektroden zumindest teilweise eine Analyt-spezifische Beschichtung oder Analyt-spezifische Mole-

küle aufweisen und über die Platte durchspannende elektrische Leiter von einer zweiten Seite der Platte her elektrisch kontaktierbar oder elektrisch kontaktiert sind. Die elektrischen Leiter können dabei mit der Platte und den Elektroden verbunden sein. Die Elektroden können aber auch dadurch von der zweiten Seite her kontaktierbar sein, dass die Platte aus einem weichen Material besteht, dass zum Kontaktieren von elektrischen Leitern bis zu den Elektroden durchstoßen werden kann. Unter Platte wird hier ein beliebiger, insbesondere flacher, eine erste und eine zweite Seite aufweisender Grundkörper verstanden. "Teilweise" bedeutet hier und im Folgenden, dass sowohl ein Teil einer einzelnen Elektrode als auch ein Teil der insgesamt vorhandenen Elektroden das jeweilige Merkmal aufweisen kann. "Analyt-spezifisch" bedeutet, dass die Beschichtung oder die Moleküle eine spezifische Affinität oder eine sonstige selektive Eigenschaft für den Analyten oder eine infolge der Anwesenheit des Analyten gebildete Substanz, z.B. ein Abbauprodukt des Analyten, aufweisen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist einfach herzustellen. Es ist nicht erforderlich eine Schutzschicht aufzutragen, um einen Kontakt der Flüssigkeit mit Elektrodenzuleitungen zu verhindern. Weiterhin ist es nicht erforderlich, eine Ausgleichsschicht aufzutragen, um eine ebene Oberfläche der Platte herzustellen. Durch das Entfallen der seitlichen Ableitungen ist es sehr kostengünstig möglich ist, die Vorrichtung in dem Bereich außerhalb der Elektroden völlig plan auszuformen. Dadurch kann die Vorrichtung gut als Boden einer Flüssigkeit aufnehmenden Kammer verwendet werden, ohne dass eine flüssigkeitsdichte Abdichtung dabei problematisch wäre. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht darin, dass eine höhere Elektrodendichte als mit seitlich abgeleiteten Elektroden möglich ist, weil zwischen den

Elektroden kein Raum für die Leitungen freigelassen werden muss.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass die
5 Kontaktierung von der zweiten Seite der Platte her kurze Leitungswege ermöglicht. Dadurch kann ein durch die verhältnismäßig langen Leitungswege bei seitlicher Ableitung der Elektroden verursachtes elektrisches Rauschen vermieden werden. Das elektrische Rauschen kann die Detektion eines Analyten
10 verhindern.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung sind die elektrischen Leiter zusammen mit den Elektroden einstückig ausgebildet. Die Elektroden und die Leiter können aus demselben Material
15 bestehen. Das ermöglicht eine gute Kontaktierbarkeit von der zweiten Seite her und eine sehr kostengünstige Herstellung. Es ist nicht erforderlich auf der ersten Seite der Platte einen elektrischen Kontakt zwischen den Elektroden und den elektrischen Leitern herzustellen.

20 Die Beschichtung oder die Analyt-spezifischen Moleküle an den Elektroden können jeweils unterschiedlich sein, so dass sich verschiedene Elektroden dadurch voneinander unterscheiden. Die Beschichtung oder die Analyt-spezifischen Moleküle können,
25 insbesondere elektrochemisch inerte, Fänger-Moleküle umfassen. Fänger-Moleküle sind dabei Moleküle, an die der Analyt oder eine infolge der Anwesenheit des Analyten gebildete Substanz, z.B. ein Abbauprodukt des Analyten, aus der Flüssigkeit heraus bindet. Bei den Fänger-Molekülen kann es sich
30 um, insbesondere einzelsträngige, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Analoga, Liganden, Haptene, Peptide, Proteine, Zucker, Lipide oder Ionenaustauscher handeln. Die Fänger-Moleküle können kovalent und/oder gerichtet an die Elektroden gebunden

sein. Der Vorteil der kovalenten Bindung besteht darin, dass die Fänger-Moleküle nicht von den Elektroden abdiffundieren können. Bei den mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung möglichen sehr kleinen Abständen zwischen den Elektroden kann bereits eine geringe Abdiffusion von Fänger-Molekülen zu einer Störung einer Nachweisreaktion führen. Unter einer gerichteten Bindung ist zu verstehen, dass die Fänger-Moleküle jeweils mit einer bestimmten Stelle des Fänger-Moleküls, z.B. mit einem Ende des Moleküls, an die Elektroden gebunden sind. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die für das Binden des Analyten verantwortliche Stelle der Fänger-Moleküle durch deren Bindung an die Elektroden nicht beeinflusst wird. Die Fänger-Moleküle können, zumindest teilweise, über eine, insbesondere elektrochemisch weit gehend inerte, Zwischenschicht an die Elektroden gebunden sein. Diese Zwischenschicht kann aus Silan gebildet sein.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung umfasst die Beschichtung mindestens einen semipermeablen Überzug der Elektroden. Die semipermeablen Überzüge können jeweils eine unterschiedliche Durchlässigkeit aufweisen, so dass die Überzüge verschiedener Elektroden unterschiedlich durchlässig sein können. Die Überzüge können selektiv für Moleküle bis zu einer bestimmten Größe durchlässig sein. Es kann sich dabei um eine polymere Matrix mit Molekularsieb-Wirkung handeln. Dadurch ist es möglich, nur kleine Moleküle, welche z.B. durch einen spezifischen Abbau eines Analyten entstehen, zu den Elektroden durchdringen zu lassen, so dass spezifisch nur diese nachgewiesen werden. Eine solche erfindungsgemäße Vorrichtung kann bei einer Prozesssteuerung zur Verfolgung von in einem Reaktor stattfindenden Umsetzungen eingesetzt werden.

Die elektrischen Leiter können in Durchbrüchen der Platte angeordnet sein, welche sich von der zweiten Seite der Platte her, insbesondere konisch, zur ersten Seite hin verjüngen. Dabei kann der elektrische Leiter nur am verjüngten Abschnitt der durch die sich verjüngende Form des Durchbruchs gebildeten Ausnehmung angeordnet sein. Er kann aber auch frei in die Ausnehmung hinein ragen. Die sich verjüngende Form der Ausnehmung erleichtert die elektrische Kontaktierung von der zweiten Seite her, weil ein zur Kontaktierung in Richtung der Elektrode geführter Leiter auch dann an die Elektrode herangeführt wird, wenn er zunächst nur in die Ausnehmung trifft.

Die Platte kann auf dem Boden einer Mikrofluidkammer angeordnet sein oder den Boden einer Mikrofluidkammer bilden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist wegen der Möglichkeit der besonders ebenen Ausführung und der damit einher gehenden guten Abdichtbarkeit dazu gut geeignet.

Bei der Vorrichtung kann es sich auch um einen Chip handeln. Darunter wird hier eine nicht notwendigerweise aus Halbleitermaterial bestehende kleine Platte mit elektronischen Mikrostrukturen verstanden.

Die Platte kann mehr als 10, vorzugsweise mehr als 100, besonders bevorzugt mehr als 1000, insbesondere mehr als 10000, Elektroden pro cm^2 aufweisen. Die Elektroden können zumindest teilweise aus Partikeln gebildet sein. Die Partikel können mit Analyt-spezifischer Beschichtung versehen sein oder Analyt-spezifische Moleküle enthalten.

Weiterhin können die Elektroden, zumindest teilweise, aus einem nichtmetallischen Leiter, insbesondere Kohlenstoff, gebildet sein. Kohlenstoff enthaltende Elektroden sind beson-

ders gut zum Nachweis von Biomolekülen geeignet. Bei den Elektroden kann es sich, zumindest teilweise, um Pencil-, Glassy-Carbon-, Kohlenstofffasern enthaltende, Kohlenstoff-Paste- oder Kunststoff-Komposit-Elektroden, vorzugsweise Grafit enthaltende Polycarbonat-Elektroden, handeln.

Bevorzugt umfassen die Elektroden mindestens eine Referenz- und mindestens eine Gegenelektrode sowie einer Vielzahl an Arbeitselektroden. Die Elektroden sind dabei elektrisch mit einem Potentiostaten zur Erzeugung eines vorgegebenen Spannungsverlaufs zwischen den Arbeitselektroden und der Referenzelektrode verbunden, wobei jeder der Arbeitselektroden ein Strom-Spannungskonverter nachgeschaltet ist. Die Strom-Spannungskonverter halten dabei sämtliche Arbeitselektroden auf demselben Potential. Weiterhin ist ein Mittel zum Messen der durch die Arbeitselektroden fließenden Ströme vorhanden. Dabei ist lediglich ein einziger Potentiostat zur Erzeugung eines an sämtliche Arbeitselektroden gleichzeitig angelegten identischen vorgegebenen Spannungsverlaufs erforderlich. Indem sämtliche Arbeitselektroden auf demselben Potential gehalten werden, ist es beispielsweise möglich, die durch die Arbeitselektroden fließenden Ströme parallel zu messen. Dazu kann jede der Arbeitselektroden über einen Stromfolger zur individuellen Auswertung der Signale virtuell an der Schaltungsmasse anliegen.

Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung zur Detektion eines Analyten in einer Flüssigkeit mit folgenden Schritten:

- a) Herstellen eines Verbunds von im Wesentlichen parallel angeordnetem länglichem Elektrodenmaterial und das Elektrodenmaterial umgebendem Isoliermaterial und

- b) Trennen des Verbundes im Wesentlichen senkrecht zur Längsrichtung des Elektrodenmaterials.

Das Trennen kann dabei durch Schneiden, Sägen oder mittels
5 einer Trennscheibe erfolgen. Darüber hinaus kann das Isoliermaterial als Stapel von Platten vorliegen, welcher nach dem Einführen oder Einfüllen eines, insbesondere pastösen, Elektrodenmaterials auseinander genommen wird.

10 Der Verbund wird vorzugsweise hergestellt mittels Umgießen eines festen Elektrodenmaterials mit einem aushärtenden Isoliermaterial. Bei dem festen Elektrodenmaterial kann es sich beispielsweise um mehrere parallel angeordnete Bleistiftminen handeln, die mit Epoxydharz umgossen werden. Weiterhin kann
15 der Verbund hergestellt werden durch Einführen eines festen Elektrodenmaterials in im Wesentlichen parallele Ausnehmungen oder Durchbrüche eines festen Isoliermaterials oder in ein plastisch verformbares Isoliermaterial. Das plastisch verformbare Isoliermaterial kann sich der Form des Elektrodenma-
20 terials beim Einführen anpassen und/oder daran nach dem Einführen durch Zusammenpressen angepasst werden. Dadurch ist ein flüssigkeitsdichter Abschluss gewährleistet.

Weiterhin kann der Verbund hergestellt werden mittels Einfül-
25 len von pastösem oder flüssigem, insbesondere aushärtendem, Elektrodenmaterial in im Wesentlichen parallele Ausnehmungen oder Durchbrüche eines festen einstückigen, insbesondere durch ein Spritzguss-Verfahren hergestellten, Isoliermaterials oder eines gestapelten plattenförmigen Isoliermaterials
30 mit sich deckend angeordneten Durchbrüchen. Die Durchbrüche sind dabei so angeordnet, dass Elektrodenmaterial, welches auf einer Seite des gestapelten Isoliermaterials eingefüllt wird, alle Durchbrüche füllt. Das Elektrodenmaterial kann in

die Durchbrüche z.B. durch Extrusion hineingepresst werden. Das dazu verwendete Verfahren kann ein aus der Herstellung von Bleistiftminen bekanntes Verfahren sein.

- 5 Der Verbund kann auch hergestellt werden durch Verbinden von Elektrodenmaterial, welches eine aus Isoliermaterial bestehende Ummantelung aufweist, insbesondere durch Verschmelzen, Vergießen oder Verkleben der Ummantelung. Das Verschmelzen kann durch Erhitzen oder chemisch erfolgen.

10 Ferner kann der Verbund hergestellt werden mittels Extrudieren eines Verbunds aus von Isoliermaterial umgebenem Elektrodenmaterial. Dabei ist sowohl das leitfähige Elektrodenmaterial als auch das Isoliermaterial plastisch so verformbar,
15 dass beide Materialien gemeinsam als Verbund extrudiert werden können. Das ermöglicht eine sehr kostengünstige Herstellung.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung zur Detektion eines Analyten in einer
20 Flüssigkeit mit folgenden Schritten:

- a) Bereitstellen einer elektrisch nichtleitenden Platte mit Durchbrüchen,
25
b) Aufbringen eines pastösen, insbesondere aushärtenden, Elektrodenmaterials auf eine erste Seite der Platte,
c) Hineindrücken des Elektrodenmaterials in die Durchbrüche
30 und
d) Entfernen des zwischen den Durchbrüchen vorhandenen Elektrodenmaterials so weit dieses Elektrodenmaterial

das in den Durchbrüchen vorhandene Elektrodenmaterial elektrisch leitend verbindet.

Das Aushärten kann z.B. durch Polymerisieren oder durch Ab-
5 kühlen erfolgen. Schritt lit. c kann gleichzeitig mit dem
Aufbringen gemäß Schritt lit. b oder danach durchgeführt wer-
den. Das Verfahren kann in der Art eines Siebdruckverfahren
durchgeführt werden, wobei statt der Farbe das Elektrodenma-
terial aufgebracht wird. Vor dem Schritt lit. b kann auf die
10 erste Seite der Platte eine Lochmaske mit den Durchbrüchen,
zumindest teilweise, entsprechenden Löchern so aufgelegt wer-
den, dass sich die Löcher mit den Durchbrüchen der Platte,
zumindest teilweise, decken. Beim Schritt lit. b wird dann
das Elektrodenmaterial auf die Lochmaske statt auf die Platte
15 aufgebracht und beim Schritt lit. c in die Durchbrüche hinein
gedrückt. Lit. d kann dann durchgeführt werden, indem die
Lochmaske von der Platte abgenommen wird. Das Verfahren hat
den Vorteil, dass Schritt lit. d deutlich vereinfacht wird
und es eine größere Elektrodenoberfläche ermöglicht, weil die
20 Elektroden auf der ersten Seite der Platte, bedingt durch die
Höhe der Lochmaske, erhaben sind. Indem bei derselben Platte
durch die Lochmaske bei wiederholt durchgeführten Schritten
lit. b bis lit. d verschiedene Durchbrüche abgedeckt und of-
fen gelassen werden, kann in die Durchbrüche unterschiedli-
25 ches Elektrodenmaterial hineingedrückt werden. Insbesondere
kann das Elektrodenmaterial unterschiedliche Analyt-
spezifische Moleküle aufweisen.

Auf das Elektrodenmaterial kann eine, insbesondere Analyt-
30 spezifische, Beschichtung aufgebracht werden. Es können auch
Analyt-spezifische Moleküle in das Elektrodenmaterial einge-
bracht werden. Beide Vorgänge können vor, nach oder während
jedem der genannten Schritte durchgeführt werden. Elektroden-

material im Sinne der Erfindung umfasst sowohl das zur Herstellung der Elektroden dienende Material als auch die daraus gebildeten Elektroden. Als Beschichtung oder Analyt-spezifische Moleküle können, insbesondere elektrochemisch inerte, Fänger-Moleküle aufgebracht oder in das Elektrodenmaterial eingebracht werden. Auf die Elektroden bzw. das Elektrodenmaterial können jeweils unterschiedliche Beschichtungen aufgebracht werden. In das Elektrodenmaterial können jeweils unterschiedliche Analyt-spezifische Moleküle eingebracht werden. Als Fänger-Moleküle können insbesondere einzelsträngige, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Analoga, Liganden, Haptene, Peptide, Proteine, Zucker, Lipide oder Ionenaustauscher verwendet werden. Die Fänger-Moleküle können kovalent und/oder gerichtet an das Elektrodenmaterial gebunden oder auf dem Elektrodenmaterial synthetisiert oder elektrochemisch abgeschieden werden. Bevorzugt werden die Fänger-Moleküle, zumindest teilweise, über eine, insbesondere elektrochemisch weit gehend inerte, Zwischenschicht an das Elektrodenmaterial gebunden oder auf der Zwischenschicht synthetisiert. Vorzugsweise wird die Zwischenschicht aus Silan gebildet. Das Elektrodenmaterial kann mit mindestens einem semipermeablen Überzug beschichtet werden. Das kann auch zusätzlich zur Beschichtung mit Fänger-Molekülen erfolgen. Das Elektrodenmaterial bzw. die Elektroden können jeweils mit unterschiedlich durchlässigen semipermeablen Überzügen beschichtet werden. Jede aus dem Elektrodenmaterial gebildete Elektrode kann einen anderen Überzug aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum elektrischen Kontaktieren einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei eine Mehrzahl einzeln ableitbarer elektrischer Leiter mit der zweiten Seite der Platte der Vorrichtung so in Kontakt gebracht werden, dass die Leiter dabei, zumindest teilweise, die Elektroden derart kontaktieren, dass die Elektroden ein-

zeln elektrisch ableitbar sind. Bevorzugt sind die Leiter
einfederbar gelagert und werden mit der zweiten Seite der
Platte so in Kontakt gebracht, dass sie dabei Einfedern. Dazu
kann z.B. eine Kontaktplatte mit Federstiften dienen. Das
5 elektrische Kontaktieren kann auch über einen Elastomer-Ver-
binder, insbesondere einen ZEBRA®-Elastomer-Verbinder, erfol-
gen. Elastomer-Verbinder bestehen aus sich abwechselnden
Schichten von elektrisch leitendem und elektrisch nicht lei-
tendem Elastomer, insbesondere Silikon-Elastomer. Die Elasto-
mer-Verbinder können flächig ausgebildet sein, wobei die
10 Schichten senkrecht zu einer Oberfläche verlaufen. Die elek-
trisch leitende Schicht ist mit leitfähigen Partikeln, z.B.
aus Silber, Gold oder Kohlenstoff, versetzt. ZEBRA®-Elasto-
mer-Verbinder werden von der Firma Fujipoly America Corpora-
15 tion, 900 Milik Street P.O. Box 119, Carteret, NJ 07008, USA
vertrieben. Durch Anlegen des ZEBRA®-Elastomer-Verbinders an
der zweiten Seite der Platte und Ausüben eines leichten
Drucks auf die Kontaktfläche zwischen der Platte und dem ZE-
BRA®-Elastomer-Verbinder kommen die Elektroden mit den leit-
20 fähigen Schichten in Kontakt. Die elektrische Ableitung der
Elektroden kann durch die Kontaktierung der leitfähigen
Schichten mit einer elektrischen Auswerteeinheit erfolgen.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfin-
25 dungsgemäßen Vorrichtung zum Nachweis mindestens eines Analy-
ten in einer Flüssigkeit, wobei die Flüssigkeit mit Elektro-
den auf der ersten Seite der Platte der Vorrichtung in Kon-
takt gebracht wird und die Elektroden von deren zweiter Seite
her elektrisch kontaktiert werden. Die Flüssigkeit wird dabei
30 vorzugsweise unter Bedingungen mit den Elektroden in Kontakt
gebracht, unter denen der Analyt oder eine infolge der Anwe-
senheit des Analyten gebildete Substanz, z.B. ein Abbaupro-
dukt des Analyten, an an den Elektroden vorhandene Fänger-

Moleküle bindet. Der an die Fänger-Moleküle gebundene Analyt oder die Substanz kann elektrisch, z.B. durch Leitfähigkeitsmessung, elektrochemisch oder optisch nachgewiesen werden.

Beim elektrochemischen Nachweis ist es vorteilhaft, wenn ein direkter Kontakt des Analyten oder der Substanz mit der Elektrode ermöglicht wird. Beim optischen Nachweis kann ein optisches Signal, wie z.B. Fluoreszenz, an den Elektroden gemessen werden. Die Identifizierung des Analyten oder der Substanz erfolgt dabei beispielsweise dadurch, dass diejenige Elektrode durch optische Detektion identifiziert wird, an welche ein fluoreszierender Analyt oder eine fluoreszierende Substanz spezifisch über die Fänger-Moleküle gebunden ist.

Dadurch, dass die Elektrode einem spezifischen Fänger-Molekül zugeordnet werden kann, kann der Analyt oder die Substanz identifiziert werden. Die Elektroden dienen bei diesem Nachweisverfahren der elektrischen Anziehung und/oder Abstossung von geladenen Analyten oder Substanzen. Durch das Anlegen eines entsprechenden Potentials an eine Elektrode können die geladenen Analyten oder die geladenen Substanzen elektrisch in den Bereich der Fänger-Moleküle transportiert werden.

Durch eine erhöhte Konzentration der Analyten oder Substanzen im Bereich der Fänger-Moleküle kann die Bindung der Analyten oder Substanzen daran beschleunigt werden. Nicht oder schwach und unspezifisch gebundene Analyten oder Substanzen können durch das Anlegen eines abstoßenden Potentials an die Elektrode davon entfernt werden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Fänger-Moleküle über eine Analyt- oder Substanz-undurchlässige Zwischenschicht an den Elektroden immobilisiert sind. Dadurch wird verhindert, dass der Analyt oder die Substanz bei einem direkten Kontakt mit der Elektrode elektrochemisch umgesetzt wird. Dies ermöglicht das Anlegen von hohen Potentialen für einen schnellen Transport der Analyten oder der Substanzen zu den Fänger-Molekülen.

Die Elektroden können mit einem semipermeablen Überzug beschichtet sein. Dadurch kann es ermöglicht werden, dass selektiv nur die Analyten, Abbauprodukte der Analyten oder die Substanzen elektrisch, elektrochemisch oder optisch nachgewiesen werden, welche den Überzug durchdringen. Vorzugsweise sind die Elektroden jeweils mit unterschiedlich durchlässigen semipermeablen Überzügen beschichtet.

Der Analyt kann ein Biomolekül, insbesondere eine Nukleinsäure, ein Protein, ein Antigen, ein Zucker, ein Lipid, eine Zelle oder ein Virus, sein. Er kann eine Markierungssubstanz aufweisen. Bei der Markierungssubstanz kann es sich z.B. um ein Enzym oder um eine redoxaktive Markierung handeln. Bei der Verwendung der Vorrichtung kann eine Redox-Reaktion oder eine katalytische Wasserstoff-Entwicklung elektrochemisch detektiert werden. Das elektrochemische Detektieren kann mittels Differenzieller Puls-Voltammetrie (DPV), Chronopotentiometrischer Stripping-Analyse (CPSA) oder des Nachweises einer Widerstands- oder Impedanzänderung erfolgen.

Das elektrochemische Detektieren kann folgende Schritte umfassen:

a) Bereitstellen einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei die Vorrichtung mindestens eine Gegen- und eine Referenzelektrode sowie eine Vielzahl von Arbeitselektroden aufweist,

b) Inkontaktbringen der Flüssigkeit mit den Arbeits-, Gegen- und Referenzelektroden,

c) gleichzeitiges Anlegen eines vorgegebenen Spannungsverlaufs zwischen den Arbeitselektroden und der Referenzelektrode und

5 d) Messen der durch die Arbeitselektroden fließenden Ströme, wobei während der Messung sämtliche Arbeitselektroden auf demselben Potential gehalten werden.

10 Zum elektrochemischen Detektieren wird vorzugsweise ein Potentialintervall zur Messung gewählt, in welchem im Wesentlichen nur der Analyt oder die Substanz ein Signal verursacht.

15 Bevorzugt werden die, insbesondere Kohlenstoff enthaltenden, Elektroden vor dem Nachweisen des Analyten mit einem Detergenz behandelt. Das kann bevor oder während die den Analyten enthaltende Flüssigkeit mit den Elektroden in Kontakt steht erfolgen. Die Behandlung mit Detergenz kann eine elektrochemische Konditionierung ersetzen. Sie ist einfacher, schneller und kostengünstiger als eine elektrochemische Konditionierung.

20 Die Elektroden können in einer Detergenz enthaltenden Flüssigkeit aufbewahrt und darin z.B. vertrieben werden. Vorzugsweise ist das Detergenz ein ionisches Detergenz. Günstigerweise liegt das Detergenz in einer Konzentration von 0,1 % bis 10 % vor. Bevorzugt weist das Detergenz in Wasser eine

25 kritische mizellare Konzentration unter 10 mmol/l, insbesondere unter 5 mmol/l, vorzugsweise unter 3 mmol/l, auf. Das Detergenz kann Natriumdodezylsulfat sein.

30 Ausführungsbeispiele der Erfindung werden anhand der Zeichnung näher erläutert. Hierin zeigen:

Fig. 1a-e eine schematische Darstellung eines Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

5 Fig. 2a-b eine schematische Darstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mittels Durchtrennen eines Verbunds aus Elektrodenmaterial und Isoliermaterial,

10 Fig. 3a-d eine schematische Darstellung eines Verfahrens zum Herstellen eines Verbunds aus parallel angeordnetem länglichem Elektrodenmaterial und Isoliermaterial,

15 Fig. 4a-d eine schematische Darstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Detektion mittels Extrusion und Durchtrennen eines dadurch hergestellten Verbunds,

20 Fig. 5 a-c eine Grundplatte zur Herstellung einer Vorrichtung zur Detektion,

25 Fig. 6 a-d eine schematische Darstellung eines siebdruckartigen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

30 Fig. 7a-b eine schematische Darstellung eines Verfahrens und einer Vorrichtung zum elektrischen Kontaktieren der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Detektion,

Fig. 8a-b eine schematische Darstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Chips mit 4x4 Elektroden,

Fig. 9 eine Abbildung des Chips,

Fig. 10 das Ergebnis zweier parallel mit dem Chip durch-
 geführter DPV-Messungen von Heringssperma-DNA
 und

Fig. 11a-c eine schematische Darstellung einer Mikrofluid-
 kammer mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur
 Detektion.

Fig. 1a zeigt einen plastisch verformbaren elektrisch isolie-
 renden Grundkörper 10 mit einer ersten Seite 12 und einer
 zweiten Seite 14. Fig. 1b zeigt vier aus Bleistiftminen ge-
 bildete Elektroden 15. In Fig. 1c ist der Grundkörper 10 mit
 darin durch mechanischen Druck eingeführten Elektroden 15
 dargestellt. Das Einführen der Elektroden erfolgt dabei der-
 art, dass jede Elektrode auf der ersten Seite 12 und der
 zweiten Seite 14 herausragt. Nach dem Einführen der Elektro-
 den 15 kann der Grundkörper 10 ausgehärtet werden. Fig. 1d
 zeigt die entstandene Vorrichtung zur Detektion 17 in der
 Aufsicht, Fig. 1e in der Seitenansicht. Die Vorrichtung 17
 kann, wie in Fig. 2a dargestellt, senkrecht entlang der Lini-
 en 16 mehrfach durchtrennt und dadurch in die in Fig. 2b dar-
 gestellten scheibenförmigen erfindungsgemäßen Vorrichtungen
 zerlegt werden. Jede der Elektroden 15 besitzt dabei Kon-
 takt zur jeweiligen Ober- und Unterseite der Scheiben.

Eine Elektrode 15 mit einer aus Isoliermaterial bestehenden
 Ummantelung 18 ist in Fig. 3a im Querschnitt und in Fig. 3b
 in der Aufsicht dargestellt. Fig. 3c und Fig. 3d zeigen einen
 durch Verbinden der Ummantelungen 18 entstandenen Verbund
 solcher Elektroden im Querschnitt und in der Aufsicht. Die

Pfeile 20 zeigen Positionen an, an denen der Verbund durchtrennt werden kann, um daraus scheibenförmige erfindungsgemäße Vorrichtungen 17 herzustellen.

5 Fig. 4a zeigt einen elektrisch isolierenden Grundkörper 10 mit vier parallelen ersten Durchbrüchen 22. Der Grundkörper 10 kann beispielsweise aus einem Kunststoff bestehen und durch ein Spritzguss-Verfahren hergestellt sein. In die ersten Durchbrüche 22 des Grundkörpers 10 kann eine Masse aus einem elektrisch leitfähigen Elektrodenmaterial 15 eingepresst werden. Das kann beispielsweise durch ein Extrusionsverfahren erfolgen, wie es üblicherweise zur Herstellung von Bleistiftminen verwendet wird. Bei dem Elektrodenmaterial 15 kann es sich um ein Material zur Herstellung von Bleistiftminen handeln. Der Grundkörper 10 kann, auch schon vor einer Aushärtung des Elektrodenmaterials 15, an den durch die Pfeile 20 angedeuteten Stellen senkrecht zu den mit Elektrodenmaterial 15 verfüllten ersten Durchbrüchen 22 durchtrennt werden. Dadurch entstehen die in Fig. 4c perspektivisch und in
20 Fig. 4d in der Aufsicht dargestellten scheibenförmigen erfindungsgemäßen Vorrichtungen 17. Alternativ zu dem mechanischen Durchtrennen des Verbunds aus Elektrodenmaterial 15 und Grundkörper 10 kann ein Stapel scheibenförmiger Grundkörper 10 mit ersten Durchbrüchen so übereinander gestapelt werden, dass sich die ersten Durchbrüche 22 decken. Beim Einfüllen des Elektrodenmaterials 15 an einem Ende des Stapels werden dann sämtliche der ersten Durchbrüche 22 der scheibenförmigen Grundkörper 10 gefüllt. Danach kann der Stapel noch vor einem Aushärten des Elektrodenmaterials auseinandergenommen werden.

30 Fig. 5c zeigt einen plattenförmigen Grundkörper 10 mit einer ersten Seite 12 und einer zweiten Seite 14 im Querschnitt. Fig. 5b zeigt diesen Grundkörper 10 in der Aufsicht von der

zweiten Seite 14 und Fig. 5a in der Aufsicht von der ersten Seite 12. Der Grundkörper 10 weist konische sich von der ersten Seite 12 zu der zweiten Seite 14 erweiternde Durchbrüche 22 auf. In Fig. 6a ist der plattenförmige Grundkörper 10 auf der ersten Seite 12 mit einer Lochmaske 24 belegt, welche Löcher 26 aufweist, die sich mit den Durchbrüchen 22 auf der ersten Seite 12 decken. Fig. 6b zeigt auf die Lochmaske 24 aufgebracht elektrisch leitfähiges pastöses Elektrodenmaterial 15. Fig. 6c zeigt das Elektrodenmaterial 15 nachdem es in einem siebdruckartigen Verfahren in die Löcher 26 und die Durchbrüche 22 hinein gepresst worden ist. In Fig. 6d ist die erfindungsgemäße Vorrichtung 17 nach Entfernen der Lochmaske 24 dargestellt.

Fig. 7a und 7b zeigen eine Vorrichtung zum elektrischen Kontaktieren 36 einer Vorrichtung zur Detektion 17. Die Vorrichtung zum elektrischen Kontaktieren 36 besteht dabei aus einer elastischen Matrix 28 aus einem elektrisch isolierenden Material. In dieser Matrix 28 sind parallel elektrisch leitfähige Stifte 30 angeordnet, welche elektrisch mit Kontakten 34 auf der Unterseite der Matrix verbunden sind. Die Stifte werden durch eine Feder 32 aus der elastischen Matrix herausgedrückt. Bevorzugt sind die Stifte 30 an der zur Kontaktierung vorgesehenen Seite spitz zulaufend. Das in Fig. 7b dargestellte Kontaktieren der Vorrichtung zur Detektion 17 durch die Vorrichtung zum elektrischen Kontaktieren 36 erfolgt durch Aneinanderdrücken der beiden Vorrichtungen 17, 36. Dabei kommen die Stifte 30 mit den Elektroden 15 in Kontakt. Die elastische Matrix 28 wird dabei gestaucht. Dadurch können die Stifte 30 in die sich zur ersten Seite 12 hin verjüngenden Durchbrüche 22 der Vorrichtung 17 zum Detektieren eindringen und dabei die Elektroden 15 kontaktieren. Durch die spitz zulaufende Form der Stifte 30, die sich verjüngenden

Durchbrüche 22 und die Form der Elektroden 15 wird eine vergrößerte Kontaktfläche der Stifte 30 mit den Elektroden 15 bereitgestellt.

- 5 Eine Anordnung von Verschaltungen 39 und einer Elektrodenhalterung 40 zum Umgießen der Elektroden 15 mit einem isolierenden Material, wie beispielsweise Epoxydharz, ist in Fig. 8a vor und in Fig. 8b nach dem Zusammenbau schematisch dargestellt. Eine der Verschaltungen 39 weist eine Öffnung 41 zum
- 10 Einfüllen des isolierenden Materials auf. Der durch die Polymerisation des Isoliermaterials entstehende Verbund aus Elektroden und Isoliermaterial kann durchtrennt werden, so dass scheibenförmige Vorrichtungen 17 zur Detektion als Chips mit
- 15 4 x 4 Elektroden entstehen. Eine solche Vorrichtung 17 ist in Fig. 9 gezeigt. Dabei dienen Bleistiftminen als Elektrodenmaterial. Die Elektroden eines der Chips sind elektrochemisch für 1 min mit 1,2 V in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,6
- 20 behandelt bzw. konditioniert worden. Die Elektroden eines anderen der Chips sind für 1 min mit 10% SDS behandelt worden. Zur Silanisierung der Elektroden wurden die Chips für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in einer Lösung
- 25 aus 1% (v/v) 3-(Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilan (Fa. Fluka), 1% (v/v) entionisiertem Wasser (Fa. Millipore) und 98% (v/v) Ethanol (Fa. Merck) inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 min bei 80 °C getrocknet.

Das Oligonukleotids TNF2 mit der Sequenz 5' cct icc cca atc cct tta tt 3' - Aminolink (SEQ ID NO: 1 - Aminolink), wobei i

30 einen Inosin-Rest darstellt, wurde als Fänger-Molekül an die silanisierten Elektroden gekoppelt. Bei dem Oligonukleotid handelt es sich um eine mit einem Aminolink versehene Sequenz aus der c-DNA des humanen Tumor Nekrose Faktor α -Gens. Zur

35 Kopplung wurde je ein Tropfen einer 150 pmol/ml Oligonukleotid in 0,1 M Na₂CO₃, pH 9,5 enthaltenden Lösung auf jede der Elektroden der Chips gesetzt. Die Chips wurden dann für eine

Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei gehen die freien Aminogruppen der Oligonukleotide mit dem Silan eine kovalente Bindung ein. Zur Abtrennung nicht kovalent gebundener Oligonukleotide wurden die Chips für eine
 5 Stunde in 2 ml 10% SDS bei RT inkubiert. Zur Absättigung noch vorhandener Bindungsstellen wurden die Chips eine Stunde bei RT in 1% Rinder-Serum-Albumin (BSA) oder Ethanolamin in Phosphat-gepufferter-Saline (PBS) inkubiert.

10 Um den Einfluss einer Elektrodenbehandlung auf die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der elektrochemischen Nukleinsäure-detektion zu untersuchen, sind die Chips in einer Lösung von 10 nmol/ml der komplementären Nukleinsäure TNF2k (SEQ ID NO: 2) in Detergenz-haltigem Hybridisierungs-Puffer (Fa. Ro-
 15 che) inkubiert und die gebundene Nukleinsäure TNF2k mittels DPV bestimmt worden. Jeweils zehn Messungen wurden mit den elektrochemisch bzw. mit Detergenz behandelten Elektroden durchgeführt. Die Detergenz-Behandlung führte zu einer Sensitivitätssteigerung von mehr als 10% gegenüber der elektroche-
 20 mischen Behandlung. Weiterhin war die Reproduzierbarkeit der Messungen mit Detergenz-behandelten Elektroden verbessert. Die Standardabweichung der Messungen Detergenz-behandelter Elektroden war um Faktor 3 geringer als bei einer elektroche-
 mischen Behandlung.

25 Fig. 10 zeigt zwei Voltammogramme, welche mittels parallel mit der in Fig. 9 gezeigten Vorrichtung 17 durchgeführten DPV-Messungen von Heringssperma-DNA ermittelt worden sind. Dazu wurde das Elektrodenmaterial der Vorrichtung 17 von des-
 30 sen zweiter Seite mittels Federkontaktstiften mit einer elektronischen Auswerteeinheit verbunden. Eine der Elektroden ist als Referenzelektrode geschaltet worden. Auf die erste Seite der Vorrichtung wurden 100 μ l einer 2 μ g/ μ l Heringssperma-DNA-Lösung in TE-Puffer (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8) auf-

gebracht und für 10 min inkubiert. Die DNA wurde parallel an mehreren Elektroden mittels DPV anhand der Oxidation von Guanin und Adenin nachgewiesen. Dabei sind in ihrer Position deckungsgleiche signifikante Guanin- und Adenin-Oxidations-
5 Peaks gemessen worden.

Fig. 11a zeigt schematisch eine Aufsicht auf eine zusammengesetzte Mikrofluidkammer 42 mit einer Vielzahl von Elektroden 15 und der Ausnehmung 46 für den Flüssigkeitsdurchtritt. Fig. 11b zeigt eine Aufsicht auf den Oberteil 44 der Mikrofluidkammer 42 und Fig. 11c auf den durch die erfindungsgemäße Vorrichtung 17 gebildeten Unterteil dieser Kammer.

Patentansprüche

1. Vorrichtung (17) zur Detektion eines Analyten in einer Flüssigkeit mit auf einer ersten Seite (12) einer elektrisch nicht leitenden und für die Flüssigkeit undurchlässigen Platte (10) angeordneten voneinander isolierten Elektroden (15), wobei die Elektroden (15) zumindest teilweise eine Analyt-spezifische Beschichtung oder Analyt-spezifische Moleküle aufweisen und über die Platte (10) durchspannende elektrische Leiter von einer zweiten Seite (14) der Platte her elektrisch kontaktierbar oder elektrisch kontaktiert sind.
2. Vorrichtung (17) nach Anspruch 1, wobei die elektrischen Leiter zusammen mit den Elektroden (15) einstückig ausgebildet sind.
3. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Beschichtung oder die Analyt-spezifischen Moleküle an den Elektroden (15) jeweils unterschiedlich ist/sind.
4. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Beschichtung oder die Analyt-spezifischen Moleküle, insbesondere elektrochemisch inerte, Fänger-Moleküle umfassen.
5. Vorrichtung (17) nach Anspruch 4, wobei die Fänger-Moleküle, insbesondere einzelsträngige, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Analoga, Liganden, Haptene, Peptide, Proteine, Zucker, Lipide oder Ionenaustauscher sind.
6. Vorrichtung (17) nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Fänger-Moleküle kovalent und/oder gerichtet an die Elektroden (15) gebunden sind.

7. Vorrichtung (17) nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die Fänger-Moleküle, zumindest teilweise, über eine, insbesondere elektrochemisch weit gehend inerte, Zwischenschicht an die Elektroden (15) gebunden sind.
- 5 8. Vorrichtung (17) nach Anspruch 7, wobei die Zwischenschicht aus Silan gebildet ist.
9. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Beschichtung mindestens einen semipermeablen Überzug der Elektroden (15) umfasst.
- 10 10. Vorrichtung (17) nach Anspruch 9, wobei die semipermeablen Überzüge jeweils eine unterschiedliche Durchlässigkeit aufweisen.
11. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die elektrischen Leiter in Durchbrüche (22) der
15 Platte (10) angeordnet sind, welche sich von der zweiten Seite (14) der Platte (10) her, insbesondere konisch, zur ersten Seite (12) hin verjüngen.
12. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Platte (10) auf dem Boden einer Mikrofluidkammer (42) angeordnet ist oder den Boden einer Mikrofluidkammer bildet.
20
13. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Platte (10) ein Chip ist.
14. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Platte (10) mehr als 10, vorzugsweise mehr als
25 100, besonders bevorzugt mehr als 1000, insbesondere mehr als 10000, Elektroden pro cm^2 aufweist.

15. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Elektroden (15), zumindest teilweise, aus Partikeln gebildet sind.
- 5 16. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Elektroden (15), zumindest teilweise, aus einem nichtmetallischen Leiter, insbesondere Kohlenstoff, gebildet sind.
17. Vorrichtung (17) nach Anspruch 16, wobei die Elektroden (15), zumindest teilweise, Pencil-, Glassy-Carbon-, Kohlenstofffasern enthaltende, Kohlenstoff-Paste- oder Kunststoff-Composit-Elektroden, vorzugsweise Grafit enthaltende Polycarbonat-Elektroden, sind.
- 15 18. Vorrichtung (17) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Elektroden (15) mindestens eine Referenz- und mindestens eine Gegenelektrode sowie einer Vielzahl an Arbeitselektroden umfassen und die Elektroden (15) elektrisch mit einem Potentiostaten zur Erzeugung eines vorgegebenen Spannungsverlaufs zwischen den Arbeitselektroden und der Referenzelektrode verbunden sind, wobei jeder der Arbeitselektroden ein Strom-Spannungskonverter nachgeschaltet ist, wobei die Strom-Spannungskonverter sämtliche Arbeitselektroden auf demselben Potential halten, und weiterhin ein Mittel zum Messen der durch die Arbeitselektroden fließenden Ströme vorhanden ist.
- 25 19. Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung (17) zur Detektion eines Analyten in einer Flüssigkeit mit folgenden Schritten:
- a) Herstellen eines Verbunds von im Wesentlichen parallel angeordnetem länglichem Elektrodenmaterial

(15) und das Elektrodenmaterial (15) umgebendem Isoliermaterial und

- b) Trennen des Verbunds im Wesentlichen senkrecht zur Längsrichtung des Elektrodenmaterials (15).

5 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Verbund hergestellt wird mittels

- a) Umgießen eines festen Elektrodenmaterials (15) mit einem aushärtenden Isoliermaterial,

10

- b) Einführen eines festen Elektrodenmaterials (15) in im Wesentlichen parallele Ausnehmungen oder Durchbrüche (22) eines festen Isoliermaterials oder in ein plastisch verformbares Isoliermaterial,

15

- c) Einfüllen von pastösem oder flüssigem, insbesondere aushärtendem, Elektrodenmaterial (15) in im Wesentlichen parallele Ausnehmungen oder Durchbrüche (22) eines festen einstückigen, insbesondere durch ein Spritzguss-Verfahren hergestellten, Isoliermaterials oder eines gestapelten plattenförmigen Isoliermaterials mit sich deckend angeordneten Durchbrüchen (22),

20

- d) Verbinden von Elektrodenmaterial (15), welches eine aus Isoliermaterial bestehende Ummantelung (18) aufweist, insbesondere durch Verschmelzen, Vergießen oder Verkleben der Ummantelung (18) oder

25

- e) Extrudieren eines Verbunds aus von Isoliermaterial (18) umgebenem Elektrodenmaterial (15).

21. Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung (17) zur Detektion eines Analyten in einer Flüssigkeit mit folgenden Schritten:

- 5 a) Bereitstellen einer elektrisch nicht leitenden
Platte (10) mit Durchbrüchen (22),
- b) Aufbringen eines pastösen, insbesondere aushärtenden, Elektrodenmaterials (15) auf eine erste Seite (12) der Platte (10),
- 10 c) Hineindrücken des Elektrodenmaterials (15) in die Durchbrüche (22) und
- d) Entfernen des zwischen den Durchbrüchen (22) vorhandenen Elektrodenmaterials (15) so weit dieses Elektrodenmaterial (15) das in den Durchbrüchen vorhandene Elektrodenmaterial (15) elektrisch leitend verbindet.
- 15

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei vor Schritt lit. b auf die erste Seite (12) der Platte (10) eine Lochmaske (24) mit den Durchbrüchen (22), zumindest teilweise, entsprechenden Löchern (26) so aufgelegt wird, dass sich die Löcher (26) mit den Durchbrüchen (22) der Platte (10), zumindest teilweise, decken, wobei beim Schritt lit. b das Elektrodenmaterial (15) auf die Lochmaske (24) statt auf die Platte (10) aufgebracht und beim Schritt lit. c in die Durchbrüche (22) hinein gedrückt wird und wobei Schritt lit. d durchgeführt wird, indem die Lochmaske (24) von der Platte (10) abgenommen wird.

20

25

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei auf das Elektrodenmaterial (15) eine, insbesondere Analytspezifische, Beschichtung aufgebracht wird oder Analyt-

spezifische Moleküle in das Elektrodenmaterial (15) eingebracht werden.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei als Beschichtung oder Analyt-spezifische Moleküle, insbesondere elektrochemisch inerte, Fänger-Moleküle aufgebracht oder eingebracht werden.
25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, wobei auf das Elektrodenmaterial (15) jeweils unterschiedliche Beschichtungen aufgebracht oder in das Elektrodenmaterial (15) jeweils unterschiedliche Analyt-spezifische Moleküle eingebracht werden.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, wobei als Fänger-Moleküle, insbesondere einzelsträngige, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Analoga, Liganden, Haptene, Peptide, Proteine, Zucker, Lipide oder Ionenaustauscher verwendet werden.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei die Fänger-Moleküle kovalent und/oder gerichtet an das Elektrodenmaterial (15) gebunden oder auf dem Elektrodenmaterial (15) synthetisiert oder elektrochemisch abgeschieden werden.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei die Fänger-Moleküle, zumindest teilweise, über eine, insbesondere elektrochemisch weit gehend inerte, Zwischenschicht an das Elektrodenmaterial (15) gebunden oder auf der Zwischenschicht synthetisiert werden.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Zwischenschicht aus Silan gebildet wird.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 29, wobei das Elektrodenmaterial (15) mit mindestens einem semipermeablen Überzug beschichtet wird.
- 5 31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Elektrodenmaterial (15) jeweils mit unterschiedlich durchlässigen semipermeablen Überzügen beschichtet wird.
32. Verfahren zum elektrischen Kontaktieren einer Vorrichtung (17) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei eine Mehrzahl einzeln ableitbarer elektrischer Leiter (30) mit der zweiten Seite (14) der Platte (10) der Vorrichtung (17) so in Kontakt gebracht werden, dass die Leiter (30) dabei, zumindest teilweise, die Elektroden (15) so kontaktieren, dass die Elektroden (15) einzeln elektrisch ableitbar sind.
- 15 33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Leiter (30) einfederbar gelagert sind und mit der zweiten Seite (14) der Platte (10) so in Kontakt gebracht werden, dass sie dabei einfedern.
34. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das elektrische Kontaktieren über einen Elastomer-Verbinder, insbesondere einen ZEBRA®-Elastomer-Verbinder, erfolgt.
- 25 35. Verwendung einer Vorrichtung (17) nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zum Nachweis mindestens eines Analyten in einer Flüssigkeit, wobei die Flüssigkeit mit Elektroden (15) auf der ersten Seite (12) der Platte (10) der Vorrichtung (17) in Kontakt gebracht wird und die Elektroden (15) von deren zweiter Seite (14) her elektrisch kontaktiert werden.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei die Flüssigkeit unter Bedingungen mit den Elektroden (15) in Kontakt gebracht wird, unter denen der Analyt oder eine infolge der Anwesenheit des Analyten gebildete Substanz an an den Elektroden (15) vorhandene Fänger-Moleküle bindet und der an die Fänger-Moleküle gebundene Analyt oder die daran gebundene Substanz elektrisch, elektrochemisch oder optisch nachgewiesen wird.
37. Verwendung nach Anspruch 35 oder 36, wobei mindestens eine Elektrode (15) mit einem semipermeablen Überzug beschichtet ist und selektiv nur solche Analyten, Abbauprodukte von Analyten oder Substanzen elektrisch, elektrochemisch oder optisch nachgewiesen werden, welche den Überzug durchdringen.
38. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 37, wobei der Analyt ein Biomolekül, insbesondere eine Nukleinsäure, ein Protein, ein Antigen, ein Zucker, ein Lipid, eine Zelle oder ein Virus, ist.
39. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 38, wobei der Analyt eine Markierungssubstanz aufweist.
40. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 39, wobei eine Redox-Reaktion oder eine katalytische Wasserstoffentwicklung elektrochemisch detektiert wird.
41. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 40, wobei das elektrochemische Detektieren mittels Differenzieller Puls-Voltammetrie (DPV), Chronopotentiometrischer Stripping Analyse (CPSA) oder des Nachweises einer Widerstands- oder Impedanzänderung erfolgt.
42. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 41, wobei das elektrochemische Detektieren folgende Schritte umfasst:

- 5 a) Bereitstellen einer Vorrichtung (17) nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Vorrichtung (17) mindestens eine Gegen- und eine Referenzelektrode sowie eine Vielzahl von Arbeitselektroden aufweist,
- b) Inkontaktbringen der Flüssigkeit mit den Arbeits-, Gegen- und Referenzelektroden,
- 10 c) gleichzeitiges Anlegen eines vorgegebenen Spannungsverlaufs zwischen den Arbeitselektroden und der Referenzelektrode und
- 15 d) Messen der durch die Arbeitselektroden fließenden Ströme, wobei während der Messung sämtliche Arbeitselektroden auf demselben Potential gehalten werden.
- 20 43. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 42, wobei zum elektrochemischen Detektieren ein Potentialintervall zur Messung gewählt wird, in welchem im Wesentlichen nur der Analyt oder die Substanz ein Signal verursacht.
44. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 43, wobei die, insbesondere Kohlenstoff enthaltenden, Elektroden (15) vor dem Nachweisen des Analyten mit einem Detergenz behandelt werden.
- 25 45. Verwendung nach Anspruch 44, wobei das Detergenz ein ionisches Detergenz ist.
46. Verwendung nach Anspruch 44 oder 45, wobei das Detergenz in einer Konzentration von 0,1% bis 10% vorliegt.
- 30 47. Verwendung nach einem der Ansprüche 44 bis 46, wobei das Detergenz in Wasser eine kritische mizellare Konzentration

on unter 10 mmol/l, insbesondere unter 5 mmol/l, vorzugsweise unter 3 mmol/l, aufweist.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 44 bis 47, wobei das Detergenz Natriumdodezylsulfat ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Detektion 17 eines Analyten in einer Flüssigkeit mit auf einer ersten Seite 12 einer elektrisch nicht leitenden und für die Flüssigkeit undurchlässigen Platte 10 angeordneten voneinander isolierten Elektroden 15, wobei die Elektroden 15 zumindest teilweise eine Analyt-spezifische Beschichtung oder Analyt-spezifische Moleküle aufweisen und über die Platte 10 durchspannende elektrische Leiter von einer zweiten Seite 14 der Platte her elektrisch kontaktierbar oder elektrisch kontaktiert sind.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare Medizin

5 <120> Vorrichtung zur Detektion eines Analyten

<130> 422215EH

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> i

25

<400> 1

cctnccccaa tccctttatt

20

30

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35

<400> 2

aataaaggga ttggggcagg

20

1/11

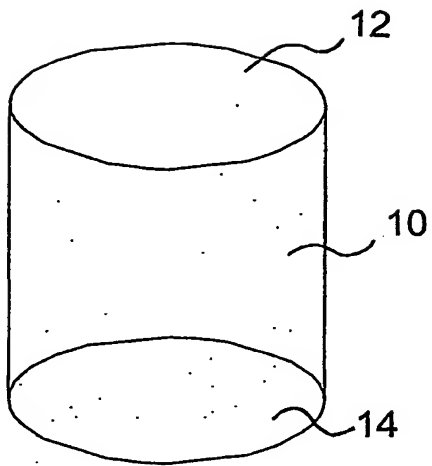


Fig. 1a

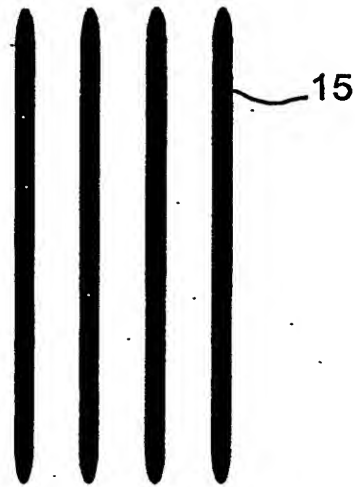


Fig. 1b

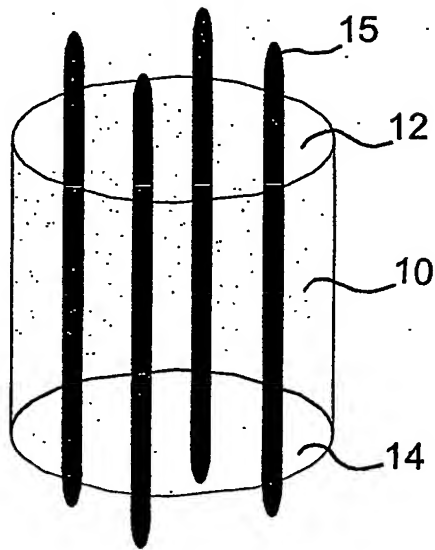


Fig. 1c

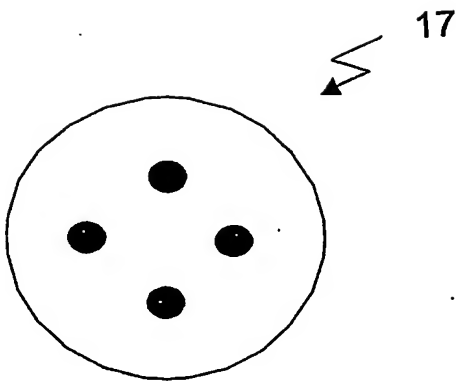


Fig. 1d

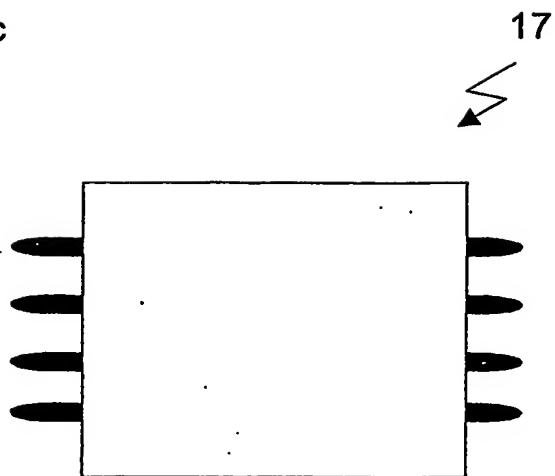


Fig. 1e

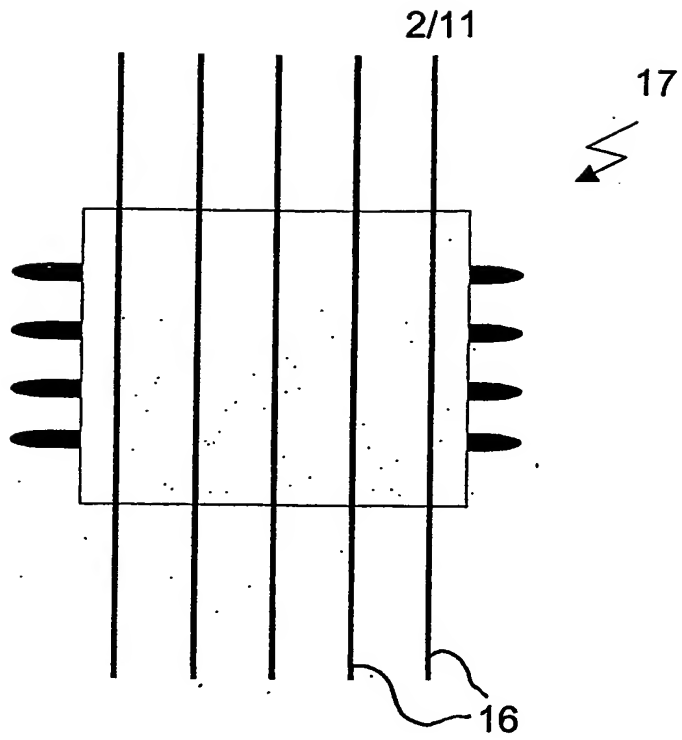


Fig. 2a

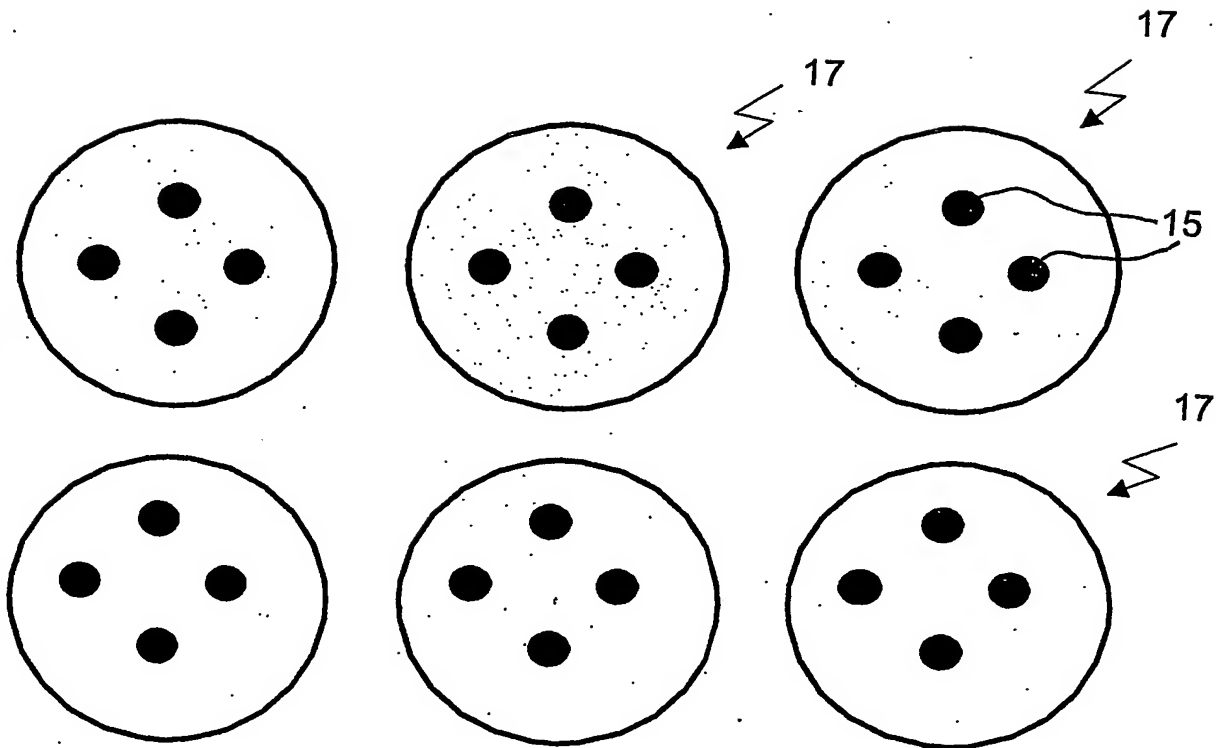


Fig. 2b

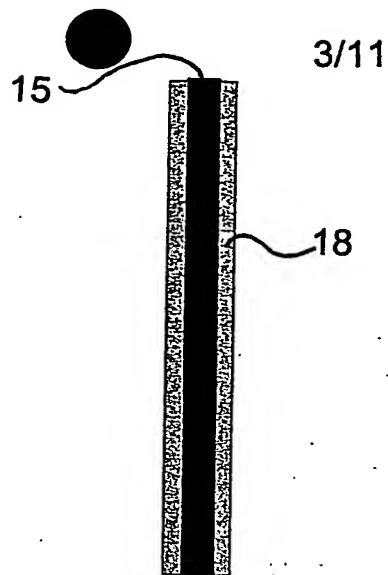


Fig. 3a

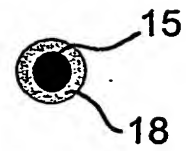


Fig. 3b

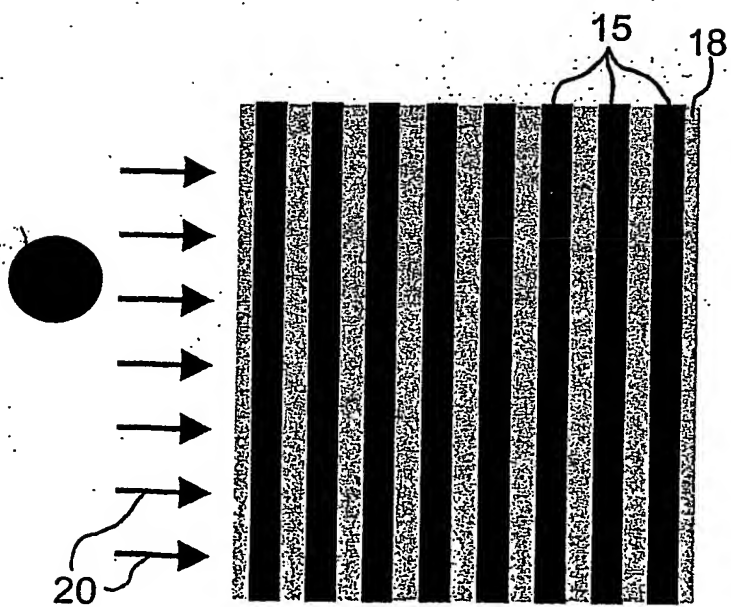


Fig. 3c

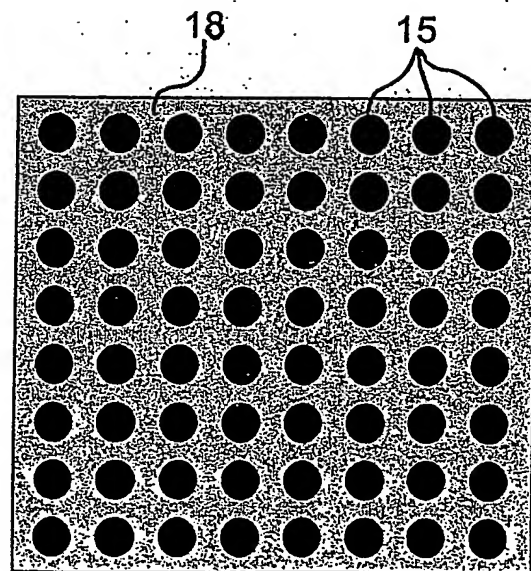


Fig. 3d

4/11

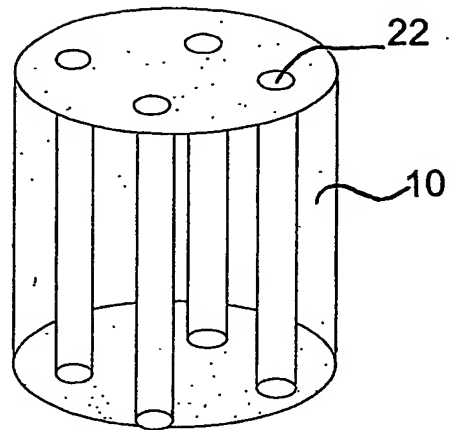


Fig. 4a

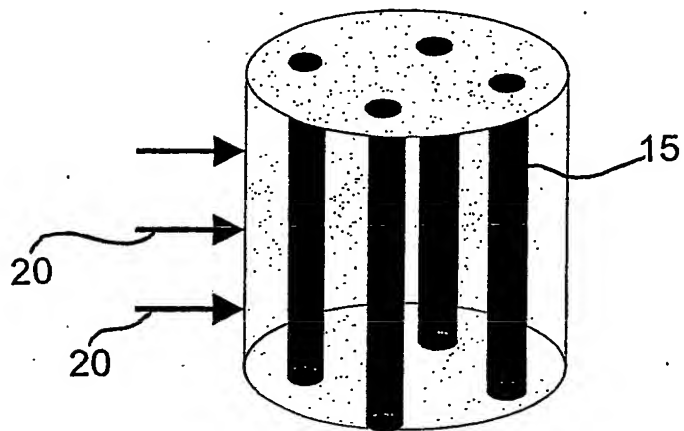


Fig. 4b

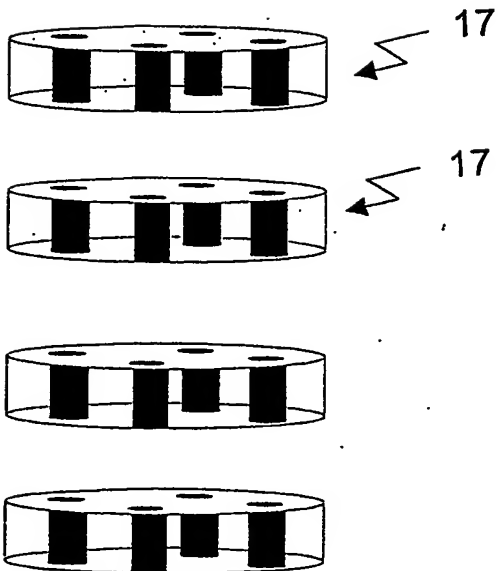


Fig. 4c

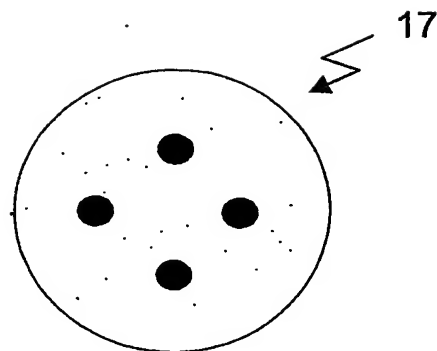


Fig. 4d

5/11

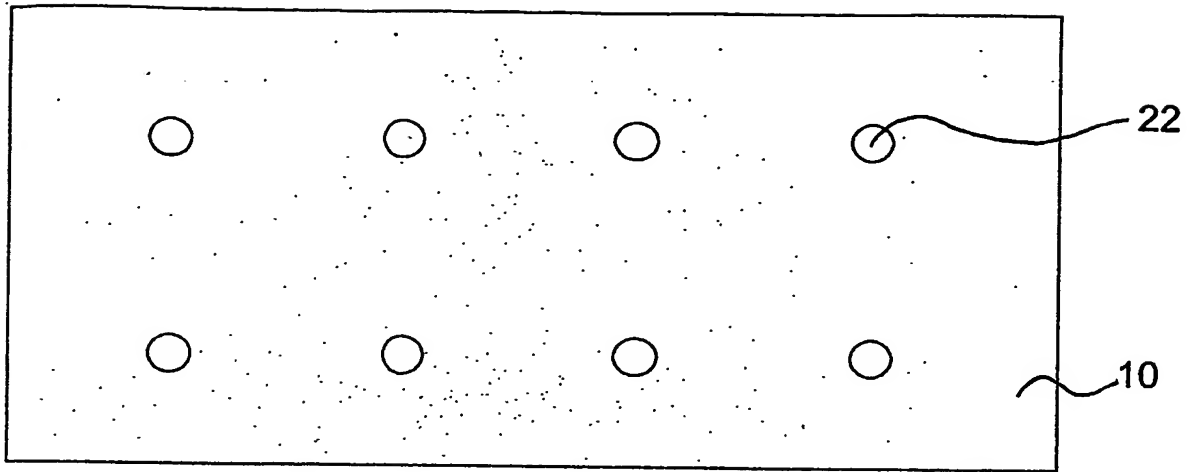


Fig. 5a

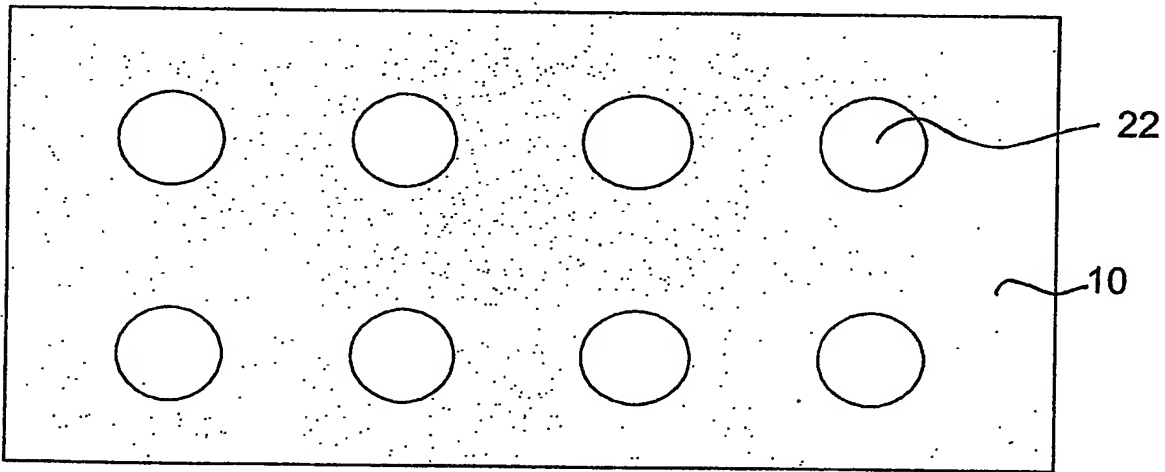


Fig. 5b

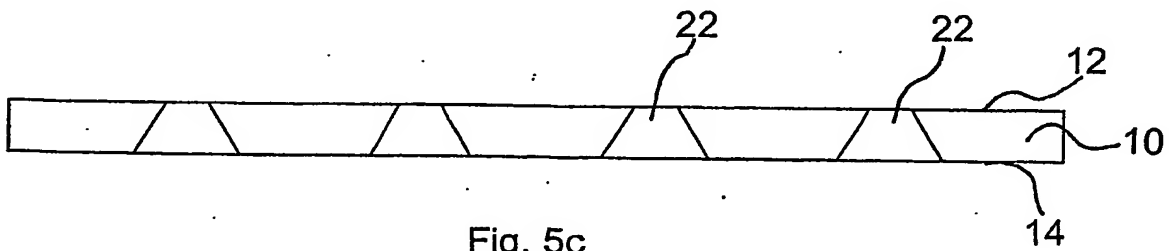


Fig. 5c

6/11

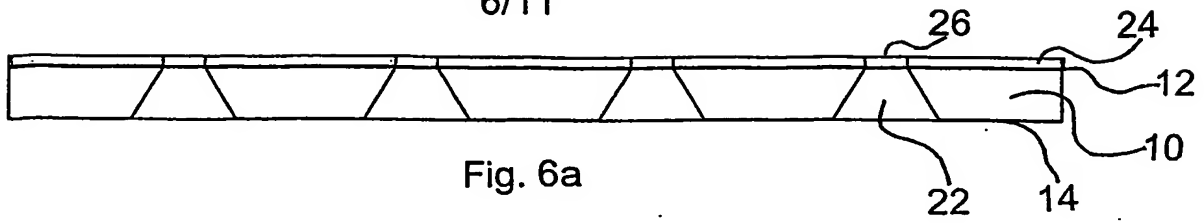


Fig. 6a

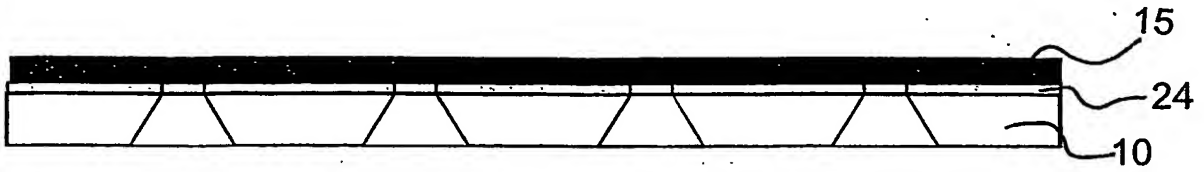


Fig. 6b

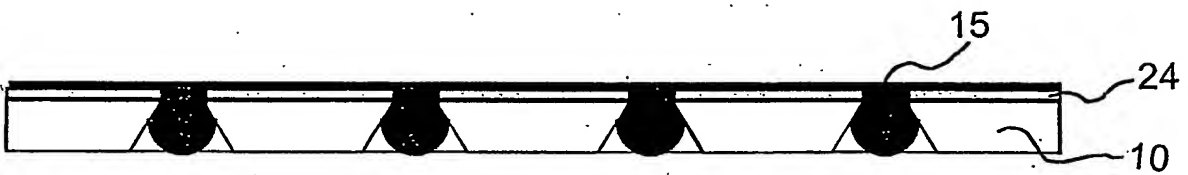


Fig. 6c

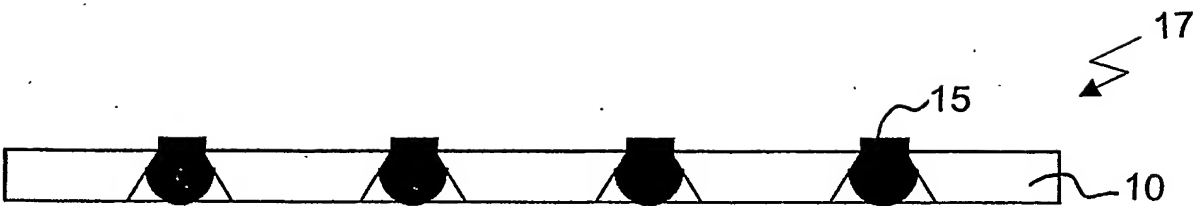


Fig. 6d

7/11

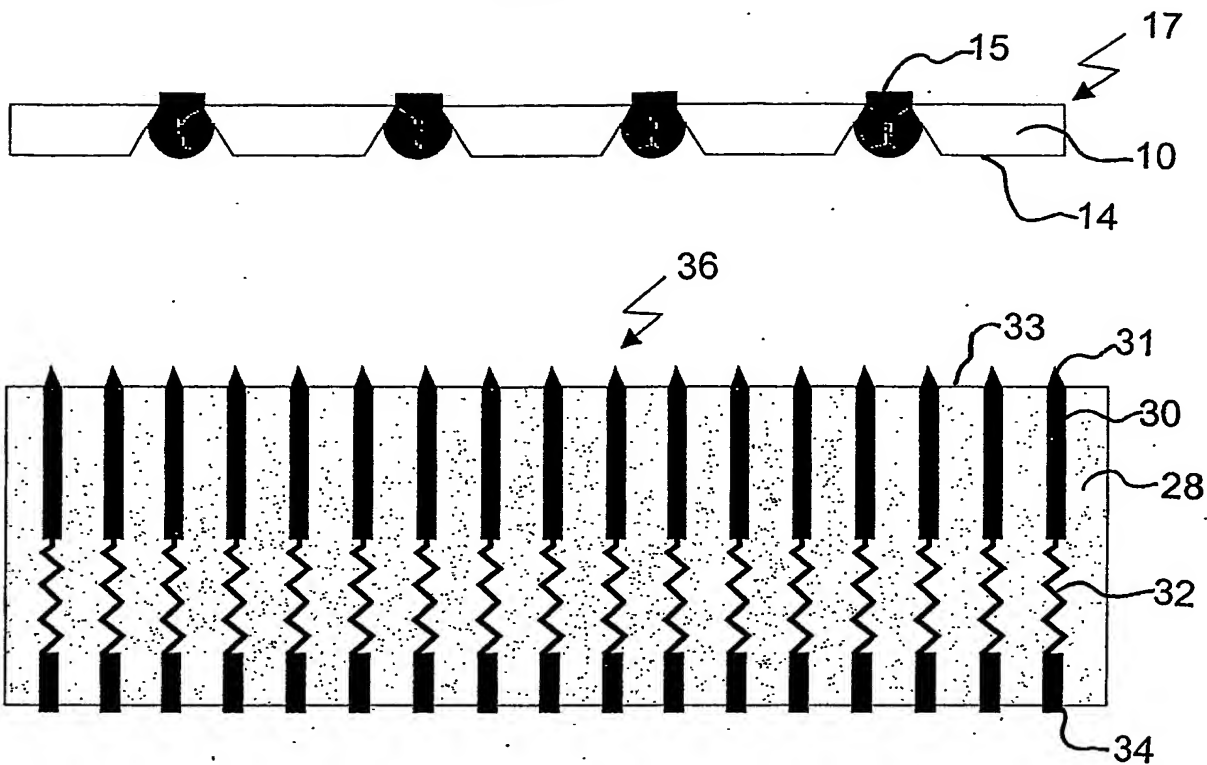


Fig. 7a

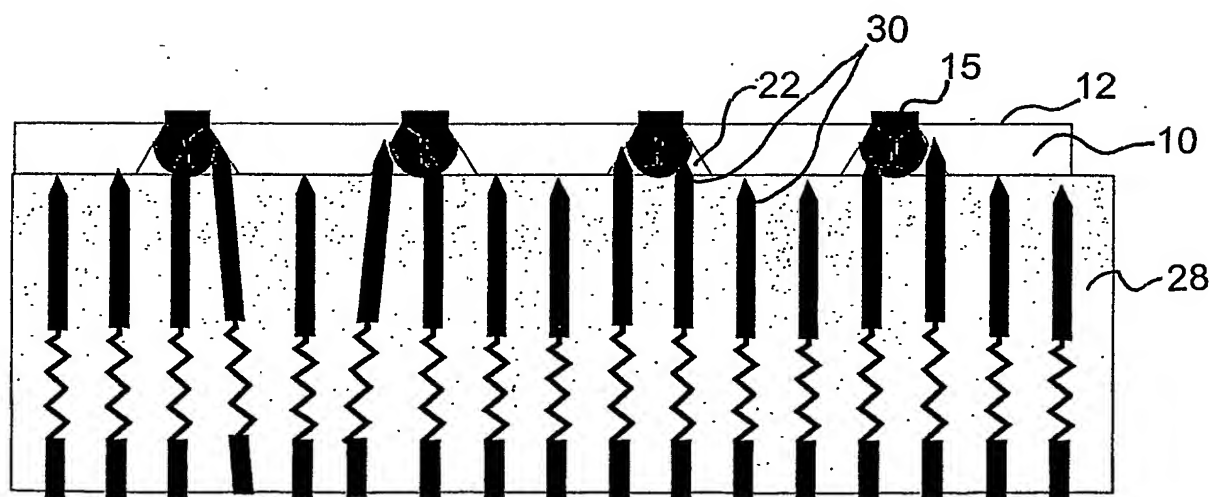


Fig. 7b

8/11

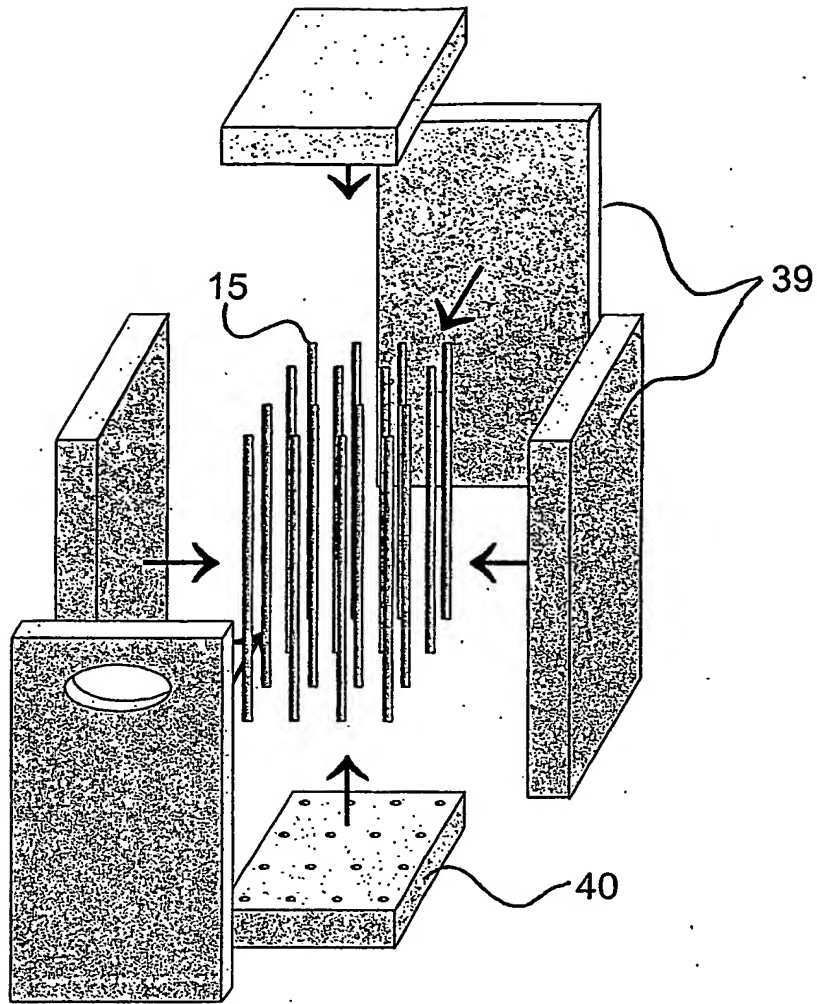


Fig. 8a

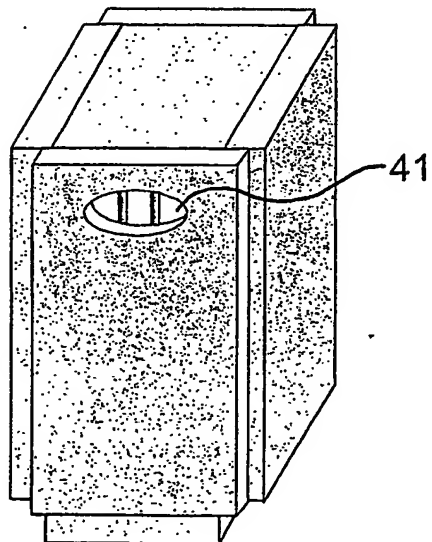


Fig. 8b

9/11

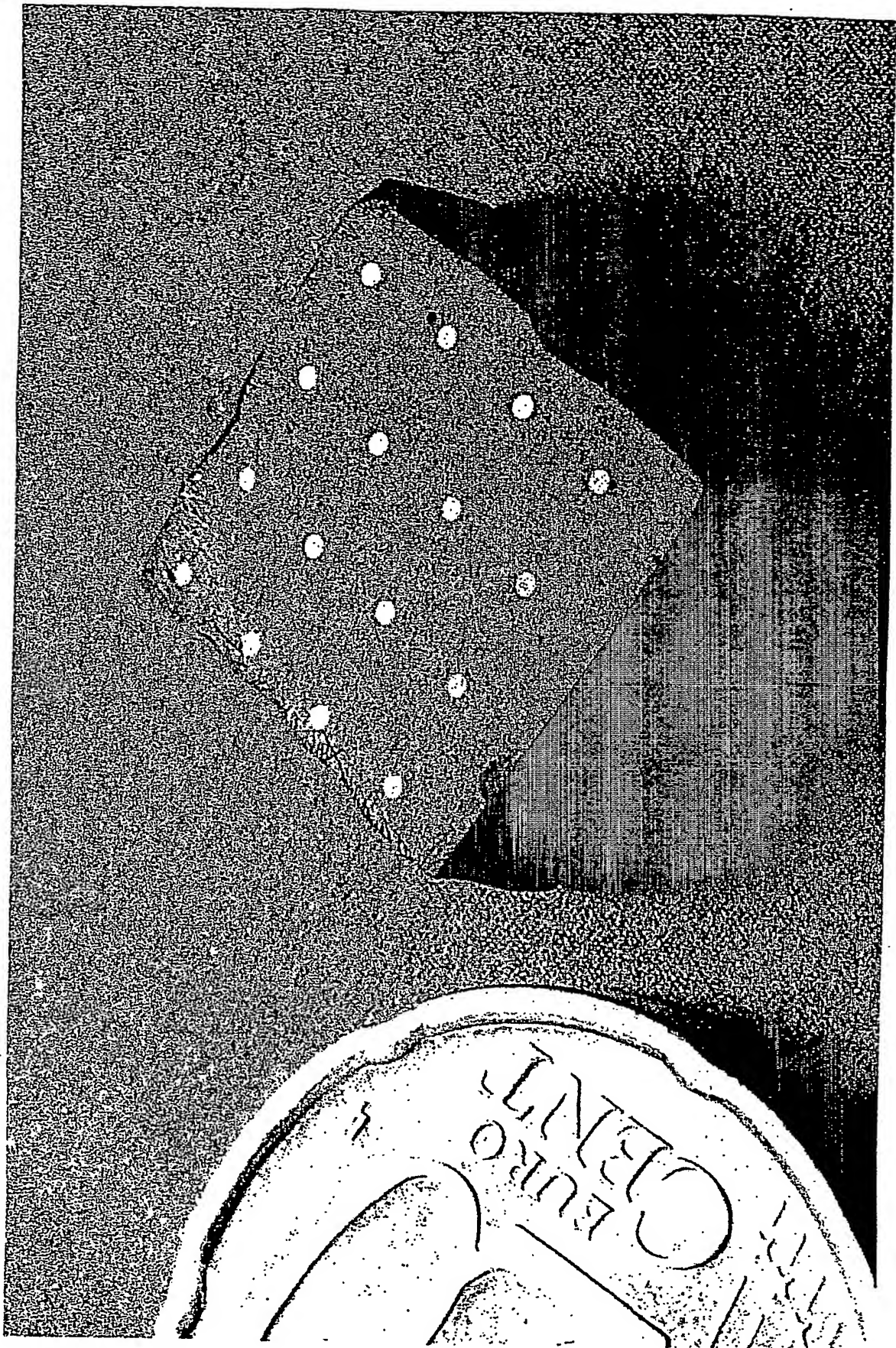


Fig. 9

10/11

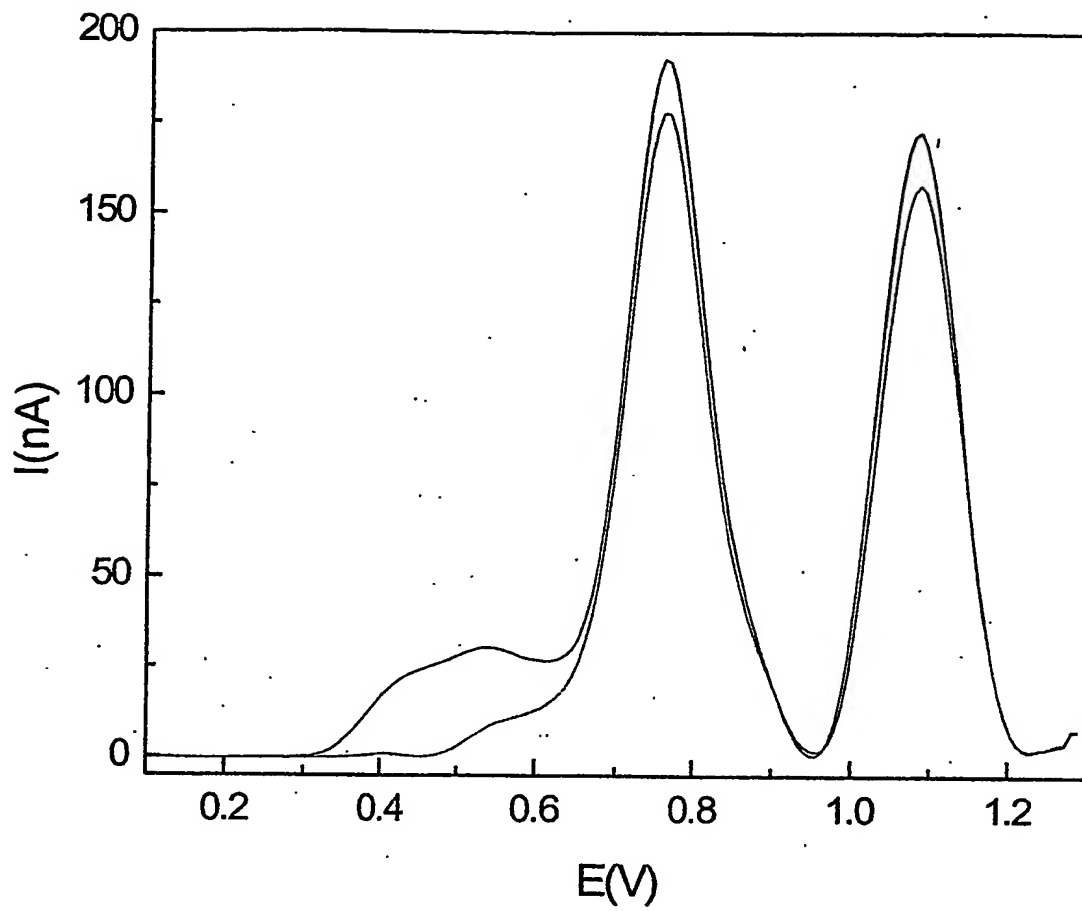
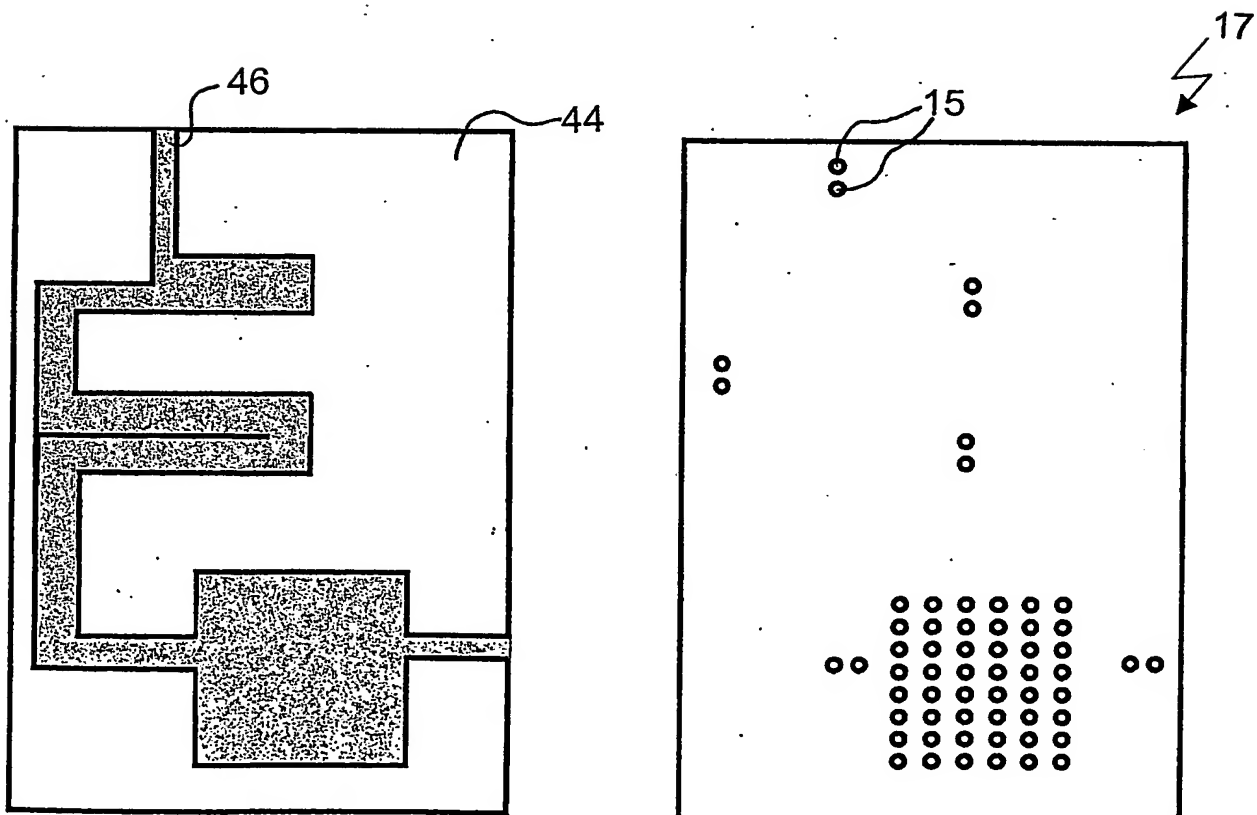
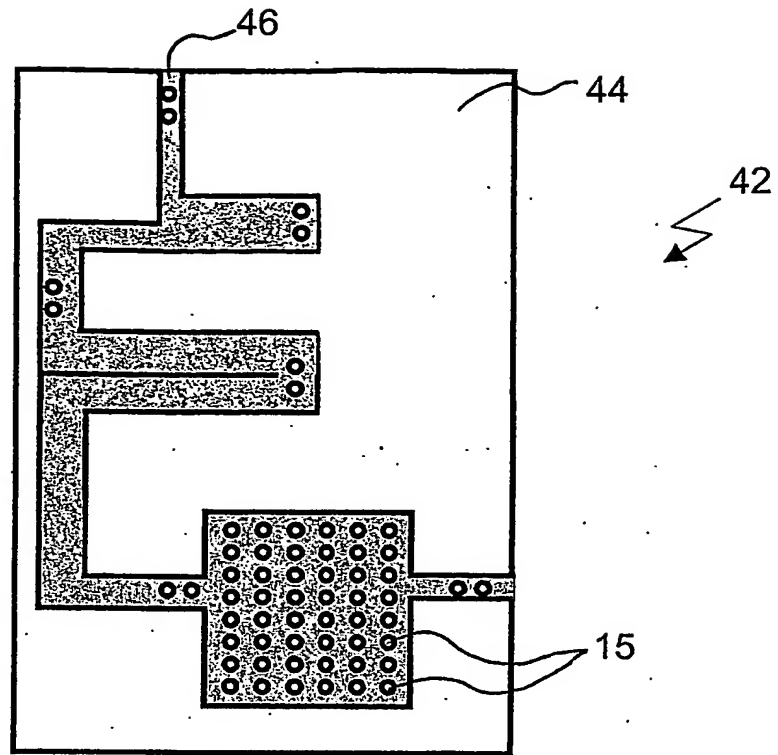


Fig. 10

11/11



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.